

POLYMER SEQUENCE FIXED DISC AND DETECTION METHOD BY FIXED POLYMER SEQUENCE

Patent number: JP2002250726
Publication date: 2002-09-06
Inventor: NOBUMASA HITOSHI; KANAI SHOZO
Applicant: TORAY INDUSTRIES
Classification:
- **International:** G01N33/53; C12M1/00; C12N15/09; C12Q1/68;
G01N1/28; G01N21/64; G01N21/78; G01N37/00
- **European:**
Application number: JP20010374020 20011207
Priority number(s): JP20010374020 20011207; JP20000373990 20001208

[Report a data error here](#)

Abstract of JP2002250726

PROBLEM TO BE SOLVED: To increase the sensitivity through reduction of background noise or the degree of freedom in repetitive measurement by enhancing the efficiency based on the high rate detection of polymer sequence, designation of detecting position (random access), and the like.

SOLUTION: The disc has a fixed polymer sequence, and the detection method comprises a step for fixing the polymer sequence, a step for touching a labeled specimen to the fixed polymer sequence, a step for interacting the fixed polymer sequence and a specimen solution, and a step for detecting a signal from a labeled material being traveled under exciting radiation light by rotating the disc.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-250726

(P 2002-250726 A)

(43) 公開日 平成14年9月6日 (2002.9.6)

(51) Int. Cl. 7

識別記号

G01N 33/53

C12M 1/00

C12N 15/09

C12Q 1/68

G01N 1/28

F 1

マークコード (参考)

G01N 33/53

M 2G043

C12M 1/00

A 2G052

C12Q 1/68

A 2G054

G01N 21/64

F 4B024

21/78

C 4B029

未請求 請求項の数14 O L (全8頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-374020 (P 2001-374020)

(71) 出願人 000003159 東レ株式会社

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

(22) 出願日 平成13年12月7日 (2001.12.7)

(72) 発明者 信正 均 滋賀県大津市園山1丁目1番1号 東レ株

(31) 優先権主張番号 特願2000-373990 (P 2000-373990)

式会社滋賀事業場内

(32) 優先日 平成12年12月8日 (2000.12.8)

(72) 発明者 金井 正三 神奈川県鎌倉市今泉台4丁目12番13号

(33) 優先権主張国 日本 (JP)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ポリマー配列固定化ディスクおよび固定化ポリマー配列による検出方法

(57) 【要約】本発明は、半導体素子による検出方法

【課題】ポリマー配列の検出高速度、検出位置の指定

(ランダムアクセス)等にもとづく効率化を図り、バッ

クグラウンドノイズ低減や測定繰り返し自由度等による

感度を高くできるようにする。

【解決手段】固定されたポリマー配列を有することを

特徴とするディスクであり、また、少なくとも、ポリマ

ー配列を固定する工程、該固定化ポリマー配列に標識化

された検体を接触させる工程、固定化ポリマー配列と検

体溶液を相互作用させる工程、ディスクを回転させ励起

放射光の下を走行させて標識材料からの信号を検出する

工程を含むことを特徴とする検出方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】固定されたポリマー配列を有することを特徴とするディスク。

【請求項2】ディスク1面あたりのポリマー配列の密度が1cm²あたり100種以下であることを特徴とする請求項1記載のポリマー配列固定化ディスク。

【請求項3】ディスクに固定されるポリマー配列の種類が、ディスクの任意の位置で全部又は一部において異なるものであることを特徴とする請求項1記載のポリマー配列固定化ディスク。

【請求項4】ポリマー配列を固定する位置の表面形状が凹型に形成されていることを特徴とする請求項1記載のポリマー配列固定化ディスク。

【請求項5】凹部の一部が溝によりつながっていることを特徴とする請求項4記載のポリマー配列固定化ディスク。

【請求項6】ポリマー配列が核酸、蛋白、糖鎖、有機化合物の少なくとも1種であることを特徴とする請求項1記載のポリマー配列固定化ディスク。

【請求項7】固定されたポリマー配列の領域の番地および／または位置情報がディスク上に予め記録されていることを特徴とする請求項1記載のポリマー配列固定化ディスク。

【請求項8】番地および／または位置情報が凹凸により記録されていることを特徴とする請求項7記載のポリマー配列固定化ディスク。

【請求項9】番地および／または位置情報が磁気、光磁気、無機もしくは有機の相変化を利用して記録されていることを特徴とする請求項7記載のポリマー配列固定化ディスク。

【請求項10】ディスク基板上に予め半径方向の位置を検出できる情報が記録されていることを特徴とする請求項1記載のポリマー配列固定化ディスク。

【請求項11】ディスクが少なくとも2層からなり、少なくとも2種類の屈折率を有することを特徴とする請求項1記載のポリマー配列固定化ディスク。

【請求項12】ディスクを形成する屈折率の大きい層が、番地および／または位置情報がディスク上に予め記録されている側に位置していることを特徴とする請求項7記載のポリマー配列固定化ディスク。

【請求項13】少なくとも、ポリマー配列を固定する工程、該固定化ポリマー配列に標識化された検体を接触させる工程、固定化ポリマー配列と検体溶液を相互作用させる工程、ディスクを回転させ、励起放射光の下を走行させて標識材料からの信号を検出する工程を含むことを特徴とする検出方法。

【請求項14】照射する励起放射光の波長の少なくとも一つが標識材料の励起波長であることを特徴とする請求項13記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ポリマー配列が固定化されたディスク材料並びに該ポリマー配列固定化ディスクに標識化された検体を相互作用させ、該ディスクを回転させ、励起放射光の下を走行させ、標識材料からの信号を検出する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、各種生物におけるゲノムプロジェクトが進められており、ヒト遺伝子をはじめとして、多数の核酸、蛋白、糖鎖などのポリマー配列が急速に明らかにされつつある。配列の明らかにされたポリマー配列の機能については、各種の方法で調べができるが、その有力な方法の一つとして、明らかにされたポリマー配列情報を利用して生体機能発現との関係を調べることが進められている。

【0003】しかし、極めて多数の遺伝子から構成される複雑な反応系全体からみると、遺伝子の総合的・系統的解析を行うことは困難である。そこで、マイクロアレイ又はチップと呼ばれる平面基板片上に、多数のポリマー配列が高密度に整列固定化されたものが用いられることにより総合的・系統的解析が進められている。多数かつ複雑な反応系の解析を行うためには、測定の高速化、高感度化の開発が重要な位置づけにある。

【0004】このような方法の具体的な例としては、例えば研究対象細胞の発現生体成分等を蛍光色素等で標識したサンプルを平面基板片上で相互作用させ、その箇所を蛍光色素等でラベル後、高解像度解析装置で高速に読みとる方法が挙げられる。こうして、サンプル中のそれぞれの生体成分量を迅速に推定できる。即ち、この新しい方法の本質は、基本的には反応試料の微量量化と、その反応試料を再現性よく多量・迅速・系統的に分析、定量しうる形に配列・整列する技術との統合である。

【0005】ポリマー配列を基板上に固定するための技術としては、ナイロンメンブレン等の上に高密度に固定化する方法の他、更に密度を高めるため、ガラス等の基板の上にポリリジン等をコーティングして固定する方法、あるいはシリコン等の基板の上にポリマー配列を直接固相合成していく方法などが開発されている。

【0006】高解像度解析装置で高速に読みとるため40に、例えば宝酒造株式会社製DNAチップ解析装置 G MSTM418 Array Scannerのように、基板表面で励起放射光を走査させて標識材料からの蛍光を検出する方法が採られており、基板の形状としては一般的には四角形で、その上を効率よく、高速に励起放射光を走査することが工夫されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかし、このように基板形状が四角形である場合、励起放射光の走査が往復異動になったり、不連続になるため、高速化が十分ではな

50く、また、励起放射光の走査範囲を広くとろうとする

と、装置が大きくなる等の問題のため、ポリマー固定化密度を高くしなければならなかった。このため、例えば特開2000-245461号公報に記載のような高密度化のための工夫が必要であった。さらに、ポリマー配列を固定化する領域の位置精度が、個々の固定化された領域に対応する情報に基づいて測定されるものではないため、測定精度引いては高感度化が十分ではなかった。

【00-0.8】また、特開2000-304688号公報には、DNAなどのポリマーを固定化したディスク状の基板を開示している。しかしながら、この方法では、ポリマーを固定化するディスク表面が平坦である。このため、同公報では、ハイブリダイゼーションの際にハイブリバックを用いており、結果的に、検体溶液の量が多くなってしまうという問題点があった。一般に検体溶液は、組織サンプル(生細胞)から調整するので、多量には用意できないことが多い。

【00-0.9】本発明の目的は、測定高速化が可能で、かつ装置の小型・シンプル化ができ、検体溶液の量を少なくでき、また、検出時の固定化ポリマー配列の番地および／または位置情報の精度を上げ、高感度化することである。さらに、基板を走行させることにより、ソイズバックグラウンドが低く、かつランダムアクセス可能で、測定を高速・高効率化することである。さらにもう、基板上の番地および／または位置情報を正確に読みとりながら測定することにより、固定されたポリマー配列の位置をランダムに検出することができ、所望の情報のみを選択して検出することにより高速化することである。

【00-1.0】
【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、固定されたポリマー配列を有することを特徴とするディスクであり、また、少なくとも、ポリマー配列を固定する工程、該固定化ポリマー配列に標識化された検体を接触させる工程、固定化ポリマー配列と検体溶液を相互作用させる工程、ディスクを回転させ励起放射光の下を走行させて標識材料からの信号を検出する工程を含むことを特徴とする検出方法である。

【00-1.1】
【発明の実施の形態】以下に、本発明のポリマー配列固定化ディスクの詳細について述べる。

【00-1.2】本発明のポリマー配列固定化ディスクでは、ポリマー配列を固定化する位置の表面形状が凹型に形成されていることが好ましい。このような構造を取ることにより、ポリマーを固定化した部分のみに検体溶液を効率よく浸すことができ、結果的に、そうでない場合に比べ、検体溶液の量を少なくすることができます。

【00-1.3】本発明のポリマー配列固定化ディスクはいろいろな構成を取り得る。例えば図1に示すように、ディスク基板裏面に番地や位置情報を有し、その下に励起放射光を反射する反射層を形成し、ディスク基板表面に基板修飾層、固定化ポリマー配列を形成した形状であつ

10

たり、図2に示すように、ディスク基板表面に番地や位置情報とポリマー配列を固定する凹部、その上に反射層、さらに修飾層、固定化ポリマーを形成した形状であったり、図3に一例を示すように、例えば図1や図2に示したディスクを2枚貼り合わせたものであっても構わない。図3には、図2の構成のディスクを2枚貼り合わせた構成を一例として示している。貼り合わせるディスクの枚数は特に限定されるものではなく、容量の点より好ましくは2枚以上である。図1および図2のポリマー配列を固定する領域とディスク裏面に有する番地や位置情報のディスク上方からの位置関係は、例えば図4に示すようであったり、また、図2のポリマー配列を固定する凹部は、検体溶液の流路を確保するために例えば図5のように、溝で結ばれていても構わない。なお、ここに述べた構成は、例であって、本発明はこれらに限るものではない。

20

【00-1.4】なお、凹部、およびこれをつなぐ溝の深さの好ましい範囲としては、0.1～0.1mm以上、1mm以下である。深さがこれより浅い範囲であると、凹部、溝を設けた効果が得られない場合があるし、これより深い範囲であると、必要となる検体溶液の量が多くなってしまう。

30

【00-1.5】本発明の基板の材料としては、有機・無機のいずれであってもかまわない。特に図1に示すような構成をとる場合は、透明な各種の合成樹脂、透明ガラスなどが使用できる。ほこり、基板の傷などの影響をさける目的で、透明基板を用い、集束した光ビームで基板側から記録を行うことが好ましく、この様な透明基板材料としては、ガラス、ポリカーボネート、ポリメチル・メタクリレート、ポリオレフィン樹脂、エボキシ樹脂、ポリイミド樹脂などがあげられる。特に、光学的複屈折が小さく、吸湿性が小さく、成形が容易であることからポリカーボネート樹脂、アモルファス・ポリオレフィン樹脂が好ましい。また耐熱性が要求される場合には、エボキシ樹脂が好ましい。第2図に示すような構成の場合は透明である必要はなく、金属、セラミックス、炭素材、低光透過性樹脂等さらに幅広い材料系から選択することができる。基板の厚さは特に限定するものではないが、0.1mm～5mmが実用的である。特に図1に示すような構成の場合、0.1mm以上とすることで、基板側から集束した光ビームで記録する場合でも、ごみの影響を受け難くなり、5mm以下とすることで、対物レンズの開口数を大きくすることが容易となり、照射光ビームスポットサイズが小さくなるため、感度、密度をあげることが容易となる。

40

【00-1.6】ディスクの大きさは特に限定するものではないが、20mmΦ～140mmΦが実用的である。特に、装置の小型化、必要検体試料を微量化することを考慮すると90mmΦがより望ましい。

【00-1.7】本発明に用いるディスク基板は、無処理の

50

状態でそのまま用いてもよいが、必要に応じて、表面修飾を施してもよい。例えば、反応性官能基を導入したディスク基板であってもよく、また、プラズマ処理やアーチ線、電子線などの放射線処理を施したディスク基板であってもよい。これらディスク基板にポリマー配列を固定する場合には、ディスク基板とポリマー配列との間における各種化学的又は物理的な相互作用、すなわちディスク基板が有している官能基と、ポリマー配列を構成する成分との間の化学的又は物理的な相互作用を利用することができる。

【0018】例えば、無修飾のポリマー配列をディスクに固定する場合には、ポリマー配列とディスクとを作させた後、ベーキングや紫外線照射により固定できる。また、アミノ基で修飾されたポリマー配列をディスクに固定する場合には、グルタルアルデヒドや1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロビル)カルボジイミド(EDC)等の架橋剤を用いてディスクの官能基と結合させることができる。ポリマー配列を含む試料をディスクに作用させる際の温度は、-5°C~95°Cが好ましく、15°C~65°Cが更に好ましい。処理時間は通常5分~24時間であり、1時間以上が好ましい。

【0019】上述の方法により得られたポリマー配列固定化ディスクは、ポリマー配列を固定した後、適当な処理をすることができる。例えば、熱処理、アルカリ処理、界面活性剤処理などを行うことにより、固定されたポリマー配列を変成させる。あるいは、細胞、菌体などの生材料から得られたポリマー配列を使用する場合は、不要な細胞成分などを除去する。そして、処理後のディスクをポリマー配列の検出材料として用いることができる。なお、これらの処理は別々に実施してもよく、同時に実施してもよい。また、ポリマー配列を含む試料をディスクに固定する前に適宜実施してもよい。

【0020】本発明のポリマー配列が固定されたディスクで、反射層を有する場合は、番地や位置情報の信号コントラストを向上させるほか、励起放射光による熱を冷却して、温度分布を均一化する効果がある。反射層の材質としては、光反射性を有する金属、合金、および金属と金属化合物の混合物などがあげられる。具体的には、Al、Au、Ag、Cuなどの高反射率の金属や、それを主成分とした合金、Al、Siなどの窒化物、酸化物、カルコゲン化物などの金属化合物が好ましい。Al、Auなどの金属、及びこれらを主成分とする合金は、光反射性が高く、かつ熱伝導率を高くできることから特に好ましい。反射層の厚さとしては、通常、おおむね5nm以上300nm以下である。適度な冷却効果と検出感度が高くなることから10nm以上200nm以下が好ましい。また、標識蛍光体からの蛍光強度と番地や位置情報の信号強度のバランスから、反射層の材料厚みは適切に選ぶことができる。

【0021】反射層の上にポリマー配列を固定する場合

は、上記ディスク基板の場合と同様、無処理の状態でそのまま用いてもよいが、必要に応じて表面修飾を施してもよい。もとより、反射層の上にポリマー配列を固定する構成の場合は、ポリマー配列を固定する領域のみ、反射層を有しないようにしても構わない。

【0022】本発明において、ディスクに固定する対象となるポリマー配列としては、デオキシリボ核酸(DNA)やリボ核酸(RNA)などの核酸や蛋白、糖鎖、有機化合物などが挙げられる。本発明に用いるポリマー配列は、市販のものでもよく、また、生細胞などから得られたものでもよい。

【0023】本発明では、ポリマー配列をそのままディスクに固定してもよく、また、ポリマー配列に化学的修飾を施した誘導体や、必要に応じて変成させたポリマー配列を固定してもよい。ポリマー配列の化学的修飾には、アミノ化、ビオチン化、ディゴキシゲニン化等が知られており本発明ではこれらの修飾法を採用することができる。

【0024】ディスク上に固定されるポリマー配列は、それぞれ異なる種類のポリマー配列としてもよい。また、同一のポリマー配列としても構わない。ポリマー配列の種類、順序は位置によって限定されるものでない。同一のポリマー配列を複数箇所に固定化しておき、測定感度をより高くすることも有効である。

【0025】固定化ポリマー配列の密度は高いほどディスク一枚あたりから得られる解析情報量は多くなる。しかし、密度が高くなりすぎると固定化ポリマー配列がない領域からの反射光を検出することによるフォーカスサポート、トラッキングサポートがとりにくくなるため、1cm²あたり100種以下であることが望ましい。より好ましくは80種以下である。

【0026】また、トラッキングをさらにとりやすくするために、同心円状に予めトラッキング検出のための信号を記録しておくことが好ましい。また、固定化ポリマーの番地および/または位置情報を予め記録しておくことが望ましい。これらの信号を記録する方法としては、基板に同心円状の溝や微細な凹部(ピット)を形成しておくことが望ましい。また、予め磁性層を成膜しておき、磁気や光磁気で検出できる信号を記録したり、無機や有機の相変化材料を予め成膜しておき、反射率で検出できる信号を記録しておくことも好ましい。

【0027】これらの溝や信号が予め形成されていることにより、固定されたポリマー配列の領域を正確に読みとり、また番地および/または位置情報記録領域などのポリマー配列が固定されていない領域を使って正確なフォーカスをとり、高い精度での測定が可能になるばかりでなく、測定したいポリマー配列の位置を指定して、その部分のみ、ランダムアクセスして、測定することが可能になり、測定データの信頼性向上、高効率化に有効である。

【0028】ポリマー配列を固定化したディスクは、固定化されたポリマー配列をプローブとして、検体と相互作用させることにより、検体中の特定の生体成分を検出することができる。本発明で言うプローブとは、検出すべき生体成分のポリマー配列と結合するものを指す。2種類の生体試料に対して、下記に示す標識化(区別が付くように)を行い、その差異を比較することもできる。

【0029】相互作用したポリマー配列を含む生体成分の検出には、相互作用を特異的に認識することができる公知の手段を用いることができる。例えば、検体中のポリマー配列に、蛍光物質、発光物質、ラジオアイソトープなどの標識体を作用させ、この標識体を検出することができる。これら標識体の種類や標識体の導入方法等に関しては、何ら制限されることなく、従来公知の各種手段を用いることができる。

【0030】さらに、本発明におけるシステム、方法には、ポリマー配列を固定する工程、固定化ポリマー配列に標識材料を付加した検体を接触させる工程、固定化ポリマー配列と検体溶液を相互作用させる工程、ディスクを回転させて励起放射光の下を走行させ、蛍光を検出する工程を含むことを特徴とするが、特に、基板を走行させるところに大きな特徴がある。基板を走行する速度、すなわち基板回転数は検出器の速度応答限界以内であれば構わないが、10 r.p.m~2500 r.p.mが望ましい。

【0031】ポリマーを固定化する方法は公知の方法で構わないが、基板に形成された番地および/または位置情報等を参考に、固定位置を決めることができる。基板に固定化されたポリマー配列に標識材料を付加した検体溶液を接触させる方法としては、ディスク基板の凹部として予め形成された位置にポリマー配列を固定しており、かつその凹部が細い溝で結ばれている場合は、ディスクの上にカバーシートやフィルムを置き、そのシートやフィルムとディスクの間にできた溝空間を使い、検体溶液を流すことにより効率よく固定化ポリマー配列と検体溶液を接触させることができる。また、予め溝が形成されていない場合は、ポリマー配列が固定化された後、ディスク上に検体溶液を基板の中心と最外周の間に円弧に沿って検体溶液を塗布し、その上にカバーシートあるいはカバーフィルムを置き、若干の圧力を加えて検体溶液を広げた後、回転による遠心力で全体に検体溶液を充填することができる。この方法においては、検体溶液を塗布する位置、塗布量、回転数、回転時間などを制御することで均一な気泡を含まない固定化ポリマーと検体溶液の接触を可能とする。

【0032】なお、標識材料には、例えば蛍光材料を用いることができる。この蛍光材料の励起波長の励起放射光を用いることにより、高感度な検出が得られる。2種類以上の蛍光材料を用いても構わない。この場合、励起放射光もそれぞれに合わせた波長の光を用いることが望

ましい。さらに、これらの励起放射光は標識材料からの蛍光を検出するだけではなく、番地および/または位置情報として記録されている信号も同時に認識することにより、より正確かつ高効率な測定が可能となる。

【0033】
【実施例】以下に、本発明を実施例を用いて具体的に説明する。ただし、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0034】実施例1

- 10 ① 加熱加圧による射出成形により、表面に番地および位置情報を検出するための凹部、ポリマー固定位置の凹部とポリマー配列固定位置をつなぐ幅0.2 mm、深さ0.1 mmの溝を形成した0.16 mm厚、8.0 mmΦのディスク状ポリカーボネート基板を成形し、これに、C r (3%)~A l (97%)のターゲットを用い、スパッタリングにより3.0 nm厚の反射層を形成した。この反射層の上を固有のガスを注入しながらプラズマ放電処理し、表面修飾した。D N Aサンプル固定化位置は1 cm²あたり50個で、大きさは0.25 mmΦとした。なお、凹部の深さは、0.1 mm、直径は、0.4 mmΦとした。この凹部に一つのD N Aスポットが設けられることになる。市販のD N A溶液A、B、C、D、Eを熱処理後、宝酒造(株)製D N Aチップ作製装置 G M S TM417-A R a y e r を用いて、予めディスク上の番地情報と対応させた位置に10個ずつスポットティングした。その後、空気中で乾燥し、紫外線を照射することにより、それぞれのD N Aサンプルを固定した。このディスクの表面側に0.5 mm厚のポリエステルフィルムからなるカバーシートを重ねた。ただし、後で検体試料溶液を全てのポリマー配列固定位置に注入するため、溝のディスク最内周および最外周部分をはじめ数カ所、カバーシートで覆われない部分を設けた。

- 20 ② 一方、2種類の核酸蛍光標識化試薬C y 3およびC y 5を用いて、D N A溶液Aの相補配列とDの相補配列を持つD N Aを標識化した。これらの標識化D N Aとハイブリダイゼーション溶液を混合して、先に準備したカバーシートを重ねたディスクの溝に沿って注入した。標識化D N A溶液全体がポリマー配列を固定化した位置全体に行きわたったのを確認して固定化ポリマー配列と検体試料溶液を接触させた。次に、このディスクを65°C、4時間放置し、固定化ポリマー配列と検体試料をハイブリダイゼーションさせた。その後カバーシートを取り除き、ディスク表面を洗浄バッファーにより室温で数回洗浄し、乾燥させた。このディスクを波長533 nmおよび635 nmのレーザーヘッドを有するドライブ(測定装置)にレーザー光が表面側になるように挿入し、1200 r.p.mで回転させながら固定化ポリマー位置以外の番地および位置情報領域からの反射光の信号を検出してオートフォーカシング、トラッキングを行わせ、番地および位置情報を検出しながらその番地に対応

する固定化ポリマー位置からの蛍光強度を検出、測定した。また、予め番地情報を指定して、所望の固定化ポリマー位置の蛍光強度を検出、測定した。得られた各蛍光強度の結果をデータ処理し、Aの相補配列のDNAは固定化Aと、Dの相補配列のDNAは固定化Dと結合することが解析できた。従来一般的な四角形のチップ、ヘッド走査型の測定方法に比べ、測定時間はほぼ半減し、感度も所望の位置を繰り返し積算する等により10倍程度向上する。

【0036】実施例2

実施例1と同様にポリカーボネート製基板を作製した。ただし、裏面に番地および位置情報のみを凹部で形成した。その面に、AUターゲットを用いて反射層を20nm形成し、その上にスピンドルコート法で樹脂製保護材料を塗布、硬化させた。この基板表面にアミノ基を含むポリマーをコーティングした。これに、基板裏面に形成した番地や位置情報の領域と重ならないように、実施例1と同様の方法でDNA溶液を固定化した。この時のスポットティングサイズは約0.15mmであった。このようにして準備したDNA溶液が固定化されたディスクの上、中心から最外周まで約1/3の位置に実施例1と同様の検体試料溶液をディスクを回転させながら塗布し、その

5' - GGGGCCATCCACAGTCTTCT-3' (以下DNA1)

5' - AGAAGACTGTGGATGGCCCC-3' (以下DNA2)

5' - CCATGGGAAGGTGAAGGTC-3' (以下DNA3)

なお、DNA1の5'末端にはチオール基(SH基)が導入されている。また、DNA2とDNA3は、それぞれ、Cy3、Cy5で標識されている。これら3種類のDNAを3×SSCに溶解し、それぞれ濃度100pmol/mlとした。

【0039】DNA1を予めディスク上の番地情報と対応させた位置(AU膜上の凹部)に10個ずつスポットティングした。風乾後、超純水中で穏やかに洗浄した。実施例1と同様に、このディスクの表面側に0.5mm厚のポリエチルフィルムからなるカバーシートを重ねDNA1が固定化されたディスクを得た。次に、DNA2溶液とDNA3溶液とを混合し、実施例1と同様にハイブリダイゼーションを行った。洗浄、検出を実施例1と同様に行なったところ、Cy5(DNA3)からの蛍光が、DNA1を固定化したスポットでのみ検出できた。また、測定時間は、ほぼ半減し、感度も所望の位置を繰り返し積算する等により10倍程度向上した。

【0040】

【発明の効果】ポリマー配列がディスク状基板に固定され、該ポリマー配列に標識材料を附加した検体を相互作用させ、該ディスク状基板を回転させて励起放射光の下を走行させて検出することにより、検体中のポリマー配列の種類および量を高速、高効率、かつ高感度で測定することができる。

【図面の簡単な説明】

後、実施例1と同様のカバーシートをのせ、押さえつけ塗布液を広げた後、さらにディスクを500rpm、1000rpmで回転させ、検体溶液をディスク全体に広げた。この状態のまま、実施例1と同様の条件で固定化DNA溶液と検体試料を相互作用させた。その後カバーシートを取り除き、洗浄して、乾燥させた。このディスクを、実施例1に比べレーザーフォーカス位置までの距離を長くとれるドライブ(測定装置)を用い、これに挿入し、実施例1と同様に測定、解析をおこなった。本実施例でも、ディスクはレーザー光が表面側から照射するように挿入した。実施例1同様の効果が得られた。

【0037】実施例3

実施例1と同様な表面に番地および位置情報を検出するための凹部、ポリマー固定位置の凹部とポリマー配列固定位置をつなぐ幅0.2mm、深さ0.1mmの溝を形成した0.6mm厚、80mmのディスク状ポリカーボネート基板をディスクを射出成型法により得た。次に、AUターゲットを用い、AU膜を30nmの厚さで、スパッタ法により作製した。

- 20 【0038】次の塩基配列を持つデオキシリボ核酸(DNA)3種類を合成委託した。

5' - GGGGCCATCCACAGTCTTCT-3' (以下DNA1)

5' - AGAAGACTGTGGATGGCCCC-3' (以下DNA2)

5' - CCATGGGAAGGTGAAGGTC-3' (以下DNA3)

【図1】本発明の好ましい実施態様の一例(ディスク断面図)

【図2】本発明の好ましい実施態様の一例(ディスク断面図)

- 30 【図3】本発明の好ましい実施態様の一例(ディスク断面図)

【図4】本発明の好ましい実施態様の一例(ディスク上視野図。固定化ポリマー位置は一部分のみを例示)

【図5】本発明の好ましい実施態様の一例(ディスク上視野図。固定化ポリマー位置およびこれらをつなぐ溝は一部分のみを例示)

【符号の説明】

1 放射励起光

2 固定化ポリマー配列

- 40 3 基板修飾層

4 基板

5 番地や位置情報部

6 反射層

7 接着層

8 ディスク外周縁

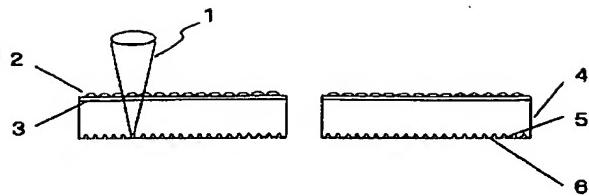
9 ディスク内周縁

10 ポリマー配列固定位置

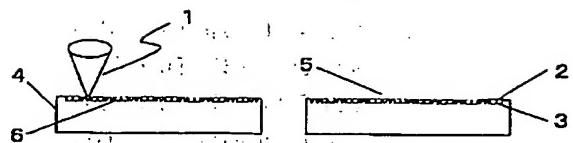
11 番地や位置情報記録部

12 溝

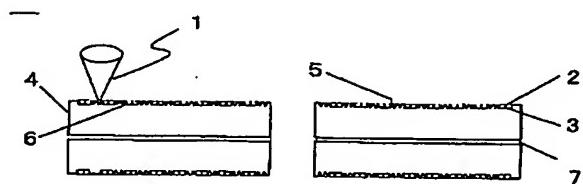
【図1】



【図2】

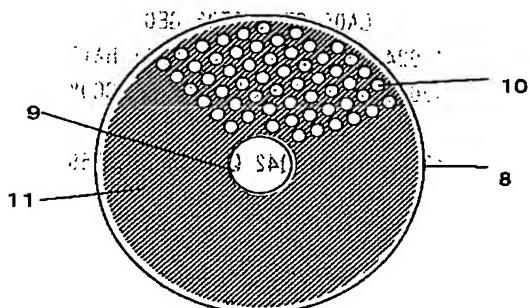


【図3】



【図4】

【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

G 01 N 21/64
21/78
37/00

識別記号

102

F I

G 01 N 37/00
1/28
C 12 N 15/00

テ-マコード(参考)

102 4B063
J
ZNAF

Fターム(参考) 2G043 AA06 BA16 CA09 DA01 DA06
EA01 FA01 GA07 GB01 KA09
LA01
2G052 AB16 AD26 AD46 CA40 DA08
DA09 EB11 EB13 EC16 FC03
FC06 FC07 FC11 FC15 FD06
FD18 FD20 GA11 GA25 HA12
HB04 JA07 JA09 JA15 JA16
2G054 BA01 CA21 CD01 CE02 EA03
EB14 FA13 FA45 GA03 GA04
GA05 GB02 GE06 GE07
4B024 AA11 BA80 CA01 CA11 HA12
4B029 AA07 BB15 BB20 CC03 CC08
FA12
4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR32 QR56
QR84 QS34 QS36 QX02

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)